

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

TB04/03204

REC'D 25 OCT 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年10月10日
Date of Application:

出願番号 特願2003-353026
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2003-353026]

出願人 東和科学株式会社
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋

BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3092678

【書類名】 特許願
【整理番号】 5882003JP
【提出日】 平成15年10月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K007/06
【国際特許分類】 C07K017/08

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術
【氏名】 中村 史

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術
【氏名】 三宅 淳

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術
【氏名】 小幡谷 育夫

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術
【氏名】 中村 徳行

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区箱崎町10-2 東和科学株式会社内
【氏名】 白井 勝久

【発明者】
【住所又は居所】 広島県広島市南区出島2丁目10番37号 東和科学株式会社内
【氏名】 犬山 康弘

【特許出願人】
【識別番号】 000223104
【氏名又は名称】 東和科学株式会社

【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
【代表者】 理事長 吉川 弘之
【連絡先】 072-751-9681

【代理人】
【識別番号】 100065215
【弁理士】
【氏名又は名称】 三枝 英二
【電話番号】 06-6203-0941

【国等の委託研究の成果に係る記載事項】 平成15年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構「生物の持つ機能を利用した環境中化学物質の高感度検出・計測技術の開発、人工抗体によるモニタリング技術の開発」委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの

【持分の割合】 25/100
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 001616
【納付金額】 5,250円

【提出物件の目録】

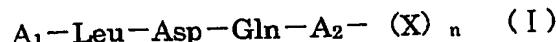
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記式 (I) :

【化 1】



n は、0または1である。

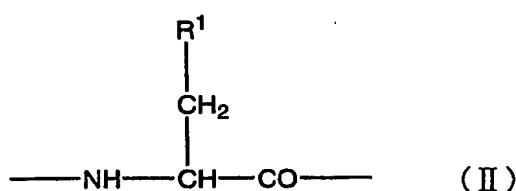
Xはアミノ酸残基を表す。

[A_1 は、環状基を持つ側鎖を有する疎水性アミノ酸残基であり、 A_2 は、脂肪族炭化水素基または芳香族炭化水素基を有する疎水性アミノ酸残基を示す。] で表されるオリゴペプチド。

【請求項 2】

A_1 が下記式 (II) :

【化 2】



[R^1 は、環状基を示す。] で表される請求項 1 に記載のオリゴペプチド。

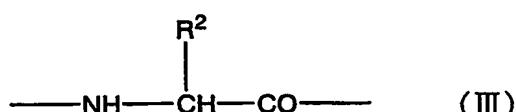
【請求項 3】

A_1 位の環状構造を持つ側鎖を有する疎水性アミノ酸残基が、フェニルアラニン、1-ナフチルアラニンまたはシクロヘキシルアラニンである請求項 1 に記載されるオリゴペプチド。

【請求項 4】

A_2 が下記式 (III) :

【化 3】



[R^2 は、直鎖または分枝鎖のアルキル基を示す。] で表される請求項 1 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 5】

A_2 位の脂肪族炭化水素基または芳香族炭化水素基を有する疎水性アミノ酸残基が、ノルバリン、バリン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシンまたはフェニルグリシンである請求項 1 に記載されるオリゴペプチド。

【請求項 6】

FLDQIである、請求項 1 に記載されるオリゴペプチド。

【請求項 7】

FLDQVである、請求項 1 に記載されるオリゴペプチド。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれかに記載されるオリゴペプチドを固相合成用ビーズに結合したペプチド固定化ビーズ。

【請求項 9】

請求項 8 に記載されるビーズとダイオキシンを含み得る被験試料および標識化物質を同時

に、または別々に結合させる工程、標識化物質の量を定量して被験試料中のダイオキシン濃度を測定する工程を含むダイオキシン検出方法。

【請求項10】

請求項8に記載されるビーズをダイオキシンを含む試料と接触させて、ダイオキシンを吸着させる工程、該ビーズに吸着したダイオキシンを溶媒を用いて溶出する工程からなるダイオキシンを濃縮する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ダイオキシン結合材料およびダイオキシン検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ダイオキシンに親和性を有するオリゴペプチド、該オリゴペプチドを結合したビーズを用いて特定のダイオキシンを検出する方法、およびダイオキシンを濃縮する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、様々な化学物質による環境汚染が深刻化しつつあり、生体への影響が懸念されている。中でもダイオキシンには、発癌性、免疫毒性、生殖毒性、催奇形性等の毒性があるため、汚染の状況を正確に測定、評価することが求められている。

【0003】

これまでダイオキシンの分析は、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた分析が公定法とされてきたが、コストが高く、前処理等の操作は煩雑で多大な労力を要し、さらに分析時間も長いため、迅速な対応が困難であった。そこで、迅速、簡便、安価で高感度な分析法の開発が急務となっている。

【0004】

このような要求に応えることの出来る有力な技術として、生体機能を活用する手法が開発されつつある。生物学的手法を用いた検出方法の代表的なものとして、抗体を標的物質に対する認識素子として利用する方法が数多く開発されており【非特許文献1】、実用化もなされている【非特許文献2】【非特許文献3】。

【0005】

しかしながら、抗体には、作製に長期間を要する、コストが高い、また低分子化学物質や毒性の高い物質の抗体を取得するのが困難であるといった問題点がある。

【0006】

さらに、土壤や焼却灰などの環境サンプルには、夾雑物質が多く含まれ、ダイオキシンの検出、化学分析に悪影響を与える。そのため、一般的にソックスレー抽出などの前処理が行われ、多大な時間と労力を要する。夾雑物質が含まれるサンプルから、目的の物質のみを吸着し、目的物質を濃縮することができれば、ダイオキシン検出、分析の簡便な前処理方法として有効である。また、ダイオキシンで汚染された土壤の洗浄、工場排水または河川の浄化等の観点からも、ダイオキシンを吸着・濃縮する方法は有効である。

【非特許文献1】前田昌子、イムノアッセイ-ロザリン・ヤローの功績ー、ぶんせき、1999、839-843

【非特許文献2】牛山正志、イムノアッセイによる環境試料の分析、ぶんせき、1998、736-747

【非特許文献3】中田昌伸、大川秀郎、モノクローナル抗体を用いた農薬のイムノアッセイ、ぶんせき、1999、492-500

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明の目的は、安価で、作製が容易な物質を用いてダイオキシンを簡易に検出または吸着および濃縮することに関する技術を提供することである。

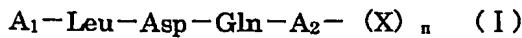
【課題を解決するための手段】

【0008】

すなわち、本発明は、以下のダイオキシンを認識する短鎖ペプチド、ならびに、それを使用して特定のダイオキシンを検出する方法ならびにダイオキシンを吸着および濃縮する方法を提供する。

【0009】

項1. 下記式(I)：

【0010】
【化4】

nは、0または1である。
Xはアミノ酸残基を表す。

【0011】

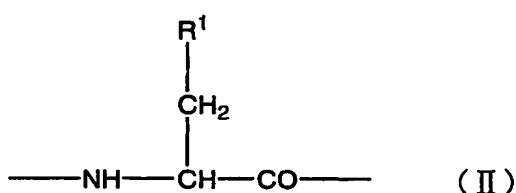
[A_1 は、環状基を持つ側鎖を有する疎水性アミノ酸残基であり、 A_2 は、脂肪族炭化水素基または芳香族炭化水素基を有する疎水性アミノ酸残基を示す。] で表されるオリゴペプチド。

【0012】

項2. A_1 が下記式(II)：

【0013】

【化5】



[R^1 は、環状基を示す。] で表される項1に記載のオリゴペプチド。

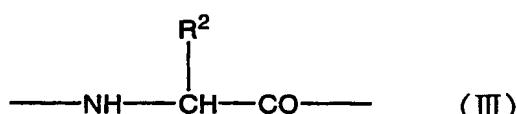
【0014】

項3. A_1 位の環状構造を持つ側鎖を有する疎水性アミノ酸残基が、フェニルアラニン、1-ナフチルアラニンまたはシクロヘキシリルアラニンである項1に記載されるオリゴペプチド。

【0015】

項4. A_2 が下記式(III)：

【化6】



[R^2 は、直鎖または分枝鎖のアルキル基を示す。] で表される項1に記載のオリゴペプチド。

【0016】

項5. A_2 位の脂肪族炭化水素基または芳香族炭化水素基を有する疎水性アミノ酸残基が、バリン、ノルバリン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシンまたはフェニルグリシンである項1に記載されるオリゴペプチド。

【0017】

項6. FLDQIである、項1に記載されるオリゴペプチド。

【0018】

項7. FLDQVである、項1に記載されるオリゴペプチド。

【0019】

項8. 項1～7のいずれかに記載されるオリゴペプチドを固相合成用ビーズに結合したペプチド固定化ビーズ。

【0020】

項9. 項8に記載されるビーズとダイオキシンを含み得る被験試料および標識化物質を

同時に、または別々に結合させる工程、標識化物質の量を定量して被験試料中のダイオキシン濃度を測定する工程を含むダイオキシン検出方法。

【0021】

項10. 項8に記載されるビーズをダイオキシンを含む試料と接触させて、ダイオキシンを吸着させる工程、該ビーズに吸着したダイオキシンを溶媒を用いて溶出する工程からなるダイオキシンを濃縮する方法。

【0022】

本発明者らは、コンビナトリアルケミストリーの手法を用いて、ペプチドライプラリーを作製し、これをスクリーニングすることによってダイオキシン結合能を有するペプチド配列を見いだした。

【0023】

本発明者らは、前記ペプチドライプラリーをコンビナトリアルケミストリーの代表的な手法であるスプリット&プール合成法（コンビナトリアルケミストリー 入門から応用まで コンビナトリアルケミストリー研究会編、化学同人、97/4）によって作製し、ペプチド固相合成用ビーズに結合してスクリーニングを行った (W. C. Chan and P. D. White, in W. C. Chan P. D. White (Ed.), *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 2000, p41)。

【0024】

本発明のダイオキシンを結合するオリゴペプチドを作製する方法は、固相合成法、液相合成法等の常法によって製造することができる。ビーズで使用する場合、固定化の手間を省くため、あらかじめビーズ上で固相合成を行うことが好ましい。

【0025】

本発明に係るオリゴペプチドの好ましい実施態様であるDB1はN末端側から、フェニルアラニン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン、イソロイシン (FLDQI) で構成される。また、DB2はN末端側からフェニルアラニン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン、バリン (FLDQV) で構成される。

【0026】

本発明の他の好ましい実施態様には、N末端側から第1残基を、式 (II) で表されるような芳香族炭化水素、飽和環状炭化水素など、環状基を持つ側鎖を有する疎水性アミノ酸残基に変更したもの、およびN末端から第5残基を、式 (III) で表されるような脂肪族炭化水素基、または芳香族炭化水素基を有する疎水性アミノ酸残基で変更したものがある。

【0027】

式 (II) 中R¹で表される環状基は、芳香族炭化水素または脂環式炭化水素のいずれでもよく、芳香族炭化水素としてフェニル、トルイル、キシレニル、ナフチル等があげられ、脂環式炭化水素として、C₃～C₈の脂環式炭化水素基、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等があげられる。R¹には、置換基を導入することが可能であり、置換基を有しないものを使用してもよい。置換基としては、メチル基、エチル基等のアルキル基、メトキシ基、アミノ基、エステル基、ニトリル基、およびフッ素、塩素、臭素、ヨウ素等のハロゲンがあげられる。これらの置換基を1～3個有することができるが、1個であることが好ましい。

【0028】

A₁としては、好ましくはフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン等があげられる。

【0029】

式 (III) 中R²で表されるアルキル基には、直鎖、分枝鎖のアルキル基のいずれを用いることも可能であるが、分枝鎖のアルキル基を使用することが好ましい。R²には、n-ブロピル、イソブロピル、n-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル等のC₃～C₆のアルキル基を使用することができる。

【0030】

本発明の好ましい実施態様において、 A_2 としては、 R^2 が直鎖のアルキル基である場合、ノルバリンおよびノルロイシン、 R^2 が分枝鎖のアルキル基である場合、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびフェニルグリシン等があげられる。

(I) 式中、Xには種々のアミノ酸残基、例えばグリシン等を用いることができるが、nは、0であることが好ましい。また、該オリゴペプチドのN末端およびC末端をアルキル化、メチル化またはエチル化することも可能である。

【0031】

本発明に係るオリゴペプチドは、N末端から2残基目がロイシン、3残基目がアスパラギン酸、4残基目がグルタミンのオリゴペプチドが最も好ましい。さらに、これらのオリゴペプチドは、L体のみで構成されたものの方が、高いダイオキシン結合能を有する。

【0032】

本発明に係るオリゴペプチドは、様々な形状の担体に結合して用いられる。担体としてビーズを使用しても良く、線維、シート等を用いても良い。ビーズ上に結合して使用する場合、該ビーズの大きさは、直径50～350mm、好ましくは直径90～150mmである。該ビーズは種々の形状をとることができる。

【0033】

また、本発明に係るオリゴペプチドは、置換率0.1～1.0mmol/g程度、好ましくは置換率0.2 mmol/g程度のポリスチレン等の疎水性ポリマーからなるビーズ上に合成することができる。

【0034】

本発明のオリゴペプチドによって検出されるダイオキシンには、ジベンゾダイオキシンとして2,3,7,8-TeCDD、1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,4,7,8-HeCDD、1,2,3,6,7,8-HeCDD、1,2,3,7,8,9-HeCDD、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD、1,2,3,4,6,7,8,9-OcCDD等があげられ、ジベンゾフランとして2,3,7,8-TeCDF、1,2,3,7,8-PeCDF、2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,4,7,8-HeCDF、1,2,3,6,7,8-HeCDF、1,2,3,7,8,9-HeCDF、2,3,4,6,7,8-HeCDF、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF、1,2,3,4,7,8,9-HpCDF、1,2,3,4,6,7,8,9-OcCDF等があげられる。

【0035】

本発明の検出方法が適用される被験物には、ダイオキシン検出の対象であれば特に限定されず、大気、土壤、焼却灰、海水や河川等の水試料、血液、母乳等の生体試料等があげられる。被験物には、必要に応じて適宜、希釀、抽出、溶出、濾過等の前処理を行い、本発明の検出方法を適用することができる。

【0036】

本発明によるダイオキシンの検出は、溶媒中にて前記オリゴペプチドを結合させた担体とダイオキシンを含み得る被験試料および標識化物質を同時に、または別々に結合させ、標識化物質の量を定量して被験試料中のダイオキシン濃度を測定することによって行われる。また、ビーズ等の担体をカラムに充填しておき、前記被験試料をカラムに通すことでも担体と接触させることも可能であるが、これに限定されない。

【0037】

一例として、ダイオキシンを含み得る被験試料および1 nMの標識化物質各1 mlに対し、ダイオキシン結合ペプチド固相合成用ビーズ（以下ダイオキシン結合ビーズ）3個を、20～30%1,4-ジオキサンを含む10mMリン酸緩衝液（pH 8）1ml中にて反応させた後、標識化物質の量を定量する方法があげられる（図1）。

【0038】

測定に用いられるダイオキシン結合ビーズの使用数は、ダイオキシンを含み得る被験試料および1 nMの標識化物質各1 mlに対し1～15個程度、好ましくは1～10個程度、最も好ましくは3個程度である。

【0039】

標識化合物の定量方法は、特に限定されないが、顕微鏡画像を記録して行うことができる、蛍光物質で標識した場合には、蛍光測定装置等を用いて上清中に存在する結合できなかった標識体の蛍光量を測定することによって行うこともできる。

【0040】

このとき、濃度既知サンプルを用いて検量線を設定することにより、ダイオキシンを定量的に検出することができる。本発明の実施例に記載される競合消光（図5）の結果は、ダイオキシン検出における検量線として、オニビーズ蛍光競合消光を用いた検出に利用することができる。検出の際、明らかな競合消光を検出するために、染色時間は12～30時間程度、好ましくは15～30時間である。

【0041】

標識化する化合物としては本発明のオリゴペプチドに結合するものであればよく、3,4-ジクロロフェノール、3,4-ジブロムフェノール、3,4,5-トリクロロフェノール、2,3,4-トリクロロフェノール等を使用することができる。また、ダイオキシンの誘導体を使用することもできる。

【0042】

上記ダイオキシンに類似の立体構造を有する化合物は、通常使用される様々な方法で標識化することができる。例えば、蛍光物質、放射性同位元素、酵素等で標識化することができ、あるいは金コロイドまたは着色ラテックスなどの色素で標識することも可能である。

【0043】

蛍光物質としては、NBD、NDA、OPA、FITC、RTIC、DTAF等があげられる。3,4-ジクロロフェノールに対しては、NBDまたはこれに類似の構造を有する蛍光物質を用いることが好ましい。

【0044】

放射性同位元素としては、³²P、³H、³⁵S、¹²⁵I、¹⁴C等を使用することができる。

【0045】

酵素としては、ペルオキシターゼ、グルコースオキシターゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等を使用することができる。

【0046】

上記の酵素を使用した場合、酵素に反応して発色する基質として、発色基質、蛍光基質または発光基質があげられる。

【0047】

発色基質としては、例えばペルオキシターゼ用に過酸化水素と組み合わせた2,2'-アジノービス(ABTS)、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(TMB)、ジアミノベンチジン(DAB)、またはアルカリホスファターゼ用に5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)等があげられる。

【0048】

蛍光基質としては、例えばアルカリホスファターゼ用に、4-メチルウムベリフェニル-ホスフェート(4MUP)、または β -D-ガラクトシダーゼ用に4-メチルウムベリフェニル- β -D-ガラクトシド(4MUG)等があげられる。

【0049】

発光基質としては、例えばアルカリホスファターゼ用に、3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスフォリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩(AMPPD)、 β -D-ガラクトシダーゼ用に、3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''- β -D-ガラクトピラノシリ)フェニル-1,2-ジオキセタン(AMGPD)、ペルオキシターゼ用に、過酸化水素と組み合わせたルミノール、またはインソルミノールがあげられる。

【0050】

これらの基質は、被験試料と反応させる前に標識化物質に反応させることができ、または溶媒中にて被験試料と反応させる際に加えることができる。

【0051】

色素としては、金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、スタンブルー、スタンレッドIV

、スタンIII、オイルオレンジ、キニザリングリーン等に代表される染料、顔料等でラテックス粒子を着色した着色ラテックス粒子等を使用することができる。

【0052】

本発明に係るダイオキシン結合能を有するオリゴペプチドは、ダイオキシンの検出および分析のための簡便な前処理におけるダイオキシン吸着材料使用することができる。さらに、吸着したダイオキシンの濃縮に使用することができる。

【0053】

本発明によるダイオキシンの吸着および濃縮は、適当な溶媒にダイオキシンを含み得る被験試料を溶解させ、そこに本発明に係るオリゴペプチドを有する担体を加えて所定時間、室温にてインキュベーションすることにより、該担体にダイオキシンを吸着させた後、適当な溶媒を用いてダイオキシンを担体から遊離、回収することにより行われる。

【0054】

溶媒としては、1,4-ジオキサンをはじめとする有機溶媒を使用することができ、例えば1,3-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン等があげられる。

【0055】

一例として、30%1,4-ジオキサンを含む10mMリン酸緩衝液(pH 8)を用いて調製したダイオキシンを含み得る被験試料溶液100mlをガラスバイアルに用意し、この溶液に、ダイオキシン結合ビーズ100個を加え、10時間、室温にてインキュベーションすることによって、ダイオキシンを該ビーズに吸着する方法があげられる。

【0056】

ダイオキシンの吸着および濃縮に用いるダイオキシン結合ビーズの数は、30%1,4-ジオキサンを含む10mMリン酸緩衝液(pH 8)を用いて調製したダイオキシンを含み得る被験試料溶液100mlに対し、50~500個程度、好ましくは50~300個程度、最も好ましくは100個程度である。該ビーズと被験試料を含む溶液をインキュベーションする時間は、5~20時間程度、好ましくは10時間程度である。

【0057】

該ビーズ上に濃縮したダイオキシンは、100%1,4-ジオキサンを用いて溶出する事ができ、ダイオキシンの濃縮は、ガスクロマトグラフィー質量分析計で溶液中の残存量測定することによって、確認が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0058】

以下、実施例挙げて本発明を詳細に説明する。

【実施例1】

【0059】

ダイオキシン結合オリゴペプチドの取得

ペプチドライブラーは、コンビナトリアルケミストリーの代表的な手法の1つであるスプリット&プール合成法を用いてペプチド固相合成用ビーズ上に構築したものを使用した。スクリーニングは図2に示すように、2段階で行い、1次スクリーニングではダイオキシンと類似した構造を有する3,4,-ジクロロフェノールを蛍光物質NBDで標識した複合体(図3)を用い、蛍光染色されるビーズの選択を行った。2次スクリーニングでは蛍光標識ジクロロフェノールにより染色されたダイオキシン結合ビーズの中から、2,3,7-トリクロロベンゼンジオキシンの競合により蛍光消光するダイオキシン結合ビーズ、すなわちダイオキシンに親和性のあるダイオキシン結合ビーズを選択した。

【0060】

スクリーニングには、5アミノ酸残基のペプチドの全配列組合せの数に等しい約250万個のビーズを用いた。1次スクリーニングは、4nM NBD標識ジクロロフェノールを含むスクリーニング用溶媒(20%1,4-ジオキサンを含む10mMリン酸緩衝液(pH 8))中で行った。まず、上記の緩衝液20mLとダイオキシン結合ビーズ約50mgを混合し、シャーレ中で、室温にて緩やかに振とうしながら一晩インキュベートした。蛍光顕微鏡で観察し、蛍光染色されたビーズをマイクロピペットにより分取した。このビーズを50%もしくは100%1,

4-ジオキサンの入ったマイクロテストチューブへ移した後、室温にて一晩インキュベートし、50%もしくは100% 1,4-ジオキサンで洗浄を行った。洗浄が不可能であったビーズは除外した。洗浄可能であったダイオキシン結合ビーズを1 nM NBD標識ジクロロフェノールで再染色した。蛍光強度測定のために、蛍光顕微鏡画像をデジタルカメラで記録した（図4）。

【0061】

1 nM NBD標識ジクロロフェノール及び、10 nMまたは100 nMの2,3,7-トリクロロジベンゾ-p-ジオキシン（2,3,7-TriCDD）を含むスクリーニング用溶媒1 mLに上記洗浄可能なダイオキシン結合ビーズを投入した。室温にて緩やかに振とうしながら、一晩インキュベートした後、ガラス製シャーレに移して蛍光顕微鏡画像を記録した。上記の試験で記録した画像と比較し、消光するビーズを選択した。図5に示すようにNBD標識ジクロロフェノール（1 nM）に対して10倍当量（10 nM）の2,3,7-TriCDD競合条件において2個のダイオキシン結合ビーズで消光が認められた。図5中のReferenceとは、一次スクリーニングにおいて蛍光染色されないと判断したビーズである。選択したビーズ上のペプチドのアミノ酸配列は、プロテインシーケンサーを用いて決定した。その結果、10 nM2,3,7-TriCDD競合で消光の確認されたビーズのオリゴペプチドは、FLDQI及びFLDQVであることが判明し、それぞれFLDQIをDB1、FLDQVをDB2とした。

【実施例2】

【0062】

ダイオキシン結合ペプチドの結合能力の評価

ダイオキシン結合ビーズを用いて、ペプチドのダイオキシン結合能力を親和性及び特異性の観点から評価した。

【0063】

4 nM NBD標識ジクロロフェノール及び0-100 nMの被検物質を含むスクリーニング溶媒1 mLをガラス製バイアル内で調製し、そこへダイオキシン結合ビーズ3個を投入した。緩やかに振とうしながら、室温にて一晩インキュベートした後、蛍光顕微鏡画像を記録した。記録した画像から各ビーズの平均輝度を算出した。平均輝度の算出は、画像解析・計測ソフトImage-Pro Plus（プラネットロン）を用いて行った。平均輝度の値から各ビーズの消光率を算出した。消光率は下記の式により算出した。消光率の値により、被検物質との親和性を評価した。

【0064】

【数1】

$$\text{消光率: } \frac{\text{輝度1}-\text{輝度2}}{\text{輝度1}} \times 100 (\%)$$

FLDQVペプチドについて、オンビーズ競合消光法により、ダイオキシンとの親和性を評価した。図6は、30%の1,4-ジオキサンを含む溶媒中で試験した結果である。2,3,7-TriCD D、2,3,7,8-TeCDDとともに濃度依存的な消光率の変化が認められ、30% 1,4-ジオキサン条件において、1 nM（約0.3 ng/mL）の2,3,7,8-TeCDDの検出が可能であることが示された。

【0065】

上記の結果を用いて、FLDQVペプチドの結合定数を算出した。以下に示されるレセプター・リガンドの1：1結合の理論式に基づくフィッティングを行った。

$$Y = \left(\frac{Y_{\max}}{2e-9} \right) * \left(\frac{1}{2} \right) * \left(\frac{(2e-9 + X * 1e-9 + 1/K_a) - ((2e-9 + X * 1e-9 + 1/K_a)^2 - 4 * 2e-9 * X * 1e-9)^{0.5}}{K_a} \right) - Y_{\min}$$

$$K_a \text{ (結合定数)} = 1000000000$$

$$Y_{\max} \text{ (消光率の最大値)} = 0.3$$

$$Y_{\min} \text{ (消光率の最小値)} = 0.1$$

その結果、2,3,7,8-TeCDDで $1.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、2,3,7-TriCDDで $2.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であり、高い親和性が示された。

【0066】

さらにオンビーズ競合消光法により、FLDQVペプチドの特異性を評価した。評価に使用した被検物質の構造を図7に示した。図8に示すようにダイオキシンおよびその類縁化合物については、2,3,7-TriCDD、2,3,7,8-TeCDD、1,2,3,7,8-PeCDDでは消光が認められたが、1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD、Dibenzo-p-dioxin、Dibenzofuran、Biphenylでは消光が認められなかった。また、その他の物質に関しては、Benzo(a)anthraceneなどの一部の多環芳香族炭化水素類で消光が認められた。しかし、PCBを用いて同様の試験を行ったところ、消光は認められなかった。このペプチドは、特定のダイオキシンに対して特異的に結合し、また一部の多環芳香族炭化水素類にも結合することが示された。

【実施例3】

【0067】

ダイオキシン結合ペプチドの配列の解析

取得されたオリゴペプチドに対して、各アミノ酸の重要性を評価し、配列の最適化を行うために、図9に示す1アミノ酸置換体ライブラリ27種を構築した。置換アミノ酸は、オリジナルアミノ酸の特徴に類似したものを非天然アミノ酸も含めて使用した。この27種に、アラニン置換体5種を加えた32種類を用いて、NBD標識ジクロロフェノールによる染色、ダイオキシン結合による消光を指標とし、評価を行った。評価した32種類のアミノ酸置換体の全配列は、表1に示される。

【0068】

【表1】

1残基目置換	
Ala	Leu Asp Gln Val
1-Naph	Leu Asp Gln Val
Tyr	Leu Asp Gln Val
cHex	Leu Asp Gln Val
Leu	Leu Asp Gln Val
Phg	Leu Asp Gln Val
Hph	Leu Asp Gln Val
2残基目置換	
Phe	Ala Asp Gln Val
Phe	Phe Asp Gln Val
Phe	Ile Asp Gln Val
Phe	Met Asp Gln Val
Phe	n-Leu Asp Gln Val
Phe	Asn Asp Gln Val
3残基目置換	
Phe Leu	Ala Gln Val
Phe Leu	Leu Gln Val
Phe Leu	n-Val Gln Val
Phe Leu	Asn Gln Val
Phe Leu	Glu Gln Val
4残基目置換	
Phe Leu Asp	Ala Val
Phe Leu Asp	Leu Val
Phe Leu Asp	n-Leu Val
Phe Leu Asp	Glu Val
Phe Leu Asp	Asn Val
5残基目置換	
Phe Leu Asp Gln	Ala
Phe Leu Asp Gln	Phg
Phe Leu Asp Gln	Leu
Phe Leu Asp Gln	n-Val
Phe Leu Asp Gln	Phe
Phe Leu Asp Gln	cHex
Phe Leu Asp Gln	Tyr
Phe Leu Asp Gln	Abu
Phe Leu Asp Gln	n-Leu

上記の評価より、アラニン置換したものでは、全て蛍光染色出来ないことから、全てのアミノ酸が結合に重要な役割を担っていることが分かった。図10に示すように、20%ジオキサン条件では、1残基目のフェニルアラニンは、1-ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニンに変更が可能であった。5残基目のバリンまたはイソロイシンは、ロイシン、フェニルグリシンに変更可能であった。30%ジオキサン条件では5残基目はn-バリンでも変更が可能であった。また、図11に示すように、FLDQVのN末フェニルアラニンをシクロヘキシルアラニンにしたビーズを用いても、2,3,7-TriCDDの競合結合による濃度依存的な蛍光消光が確認された。

【0069】

DB2のN末端のアミンをアセチル化されたものは全く染色されず、末端アミンのチャージ

出証特2004-3092678

が結合に重要であることが示唆された。

【実施例4】

【0070】

オンビーズダイオキシン検出方法

濃度既知サンプル ($1 \mu\text{l}$) を $1 \mu\text{M}$ のNBD標識ジクロロフェノール ($1 \mu\text{l}$) およびダイオキシン結合ビーズ (3個) と共に20~30% 1,4-ジオキサンを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 8) 1ml中にて反応させた後、ビーズの蛍光顕微画像を記録し、検量線を設定した。次に、被験物を標識化ジクロロフェノールおよびダイオキシン結合ビーズと反応させ、得られた結果を検量線と比較することで被験物中のダイオキシン濃度を求めた。

【0071】

図6に示す競合消光の結果は、ダイオキシン検出における検量線であると考えることができ、オンビーズ蛍光競合消光を用いた検出に利用出来る。

【0072】

図12に、染色にかかる時間を示した。10 nMの2,3,7-TriCDDに対して1~10 nMのNBD標識ジクロロフェノールの競合させた結果、明らかな消光を検出するには15時間以上のインキュベーションが必要であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0073】

本発明によれば、安価で、作成が容易な物質を用いたダイオキシンの検出手段を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】図1は、ダイオキシン検出の工程を示す。

【図2】図2は、ダイオキシン認識ペプチドのスクリーニングの工程を示す。

【図3】図3は、NBD標識ジクロロフェノールおよびダイオキシンの構造を示す。

【図4】図4は、蛍光染色されたダイオキシン結合ビーズの蛍光顕微鏡画像を示す。

図中、円形のものが蛍光染色されたダイオキシン結合ビーズである。

【図5】図5は、FLDQVペプチドのオンビーズ競合消光試験の結果を示す。表中、円形のものがダイオキシン結合ビーズである。

【図6】図6は、30% 1,4-ジオキサンを含む溶媒中で行った、FLDQVペプチドのオンビーズ競合消光試験の結果をグラフに表す。

【図7】図7は、オンビーズ競合消光法によりFLDQVペプチドの特異性を評価した際に用いた、被験試料の構造を示す。

【図8】図8は、FLDQVペプチドの結合特異性をグラフに表す。

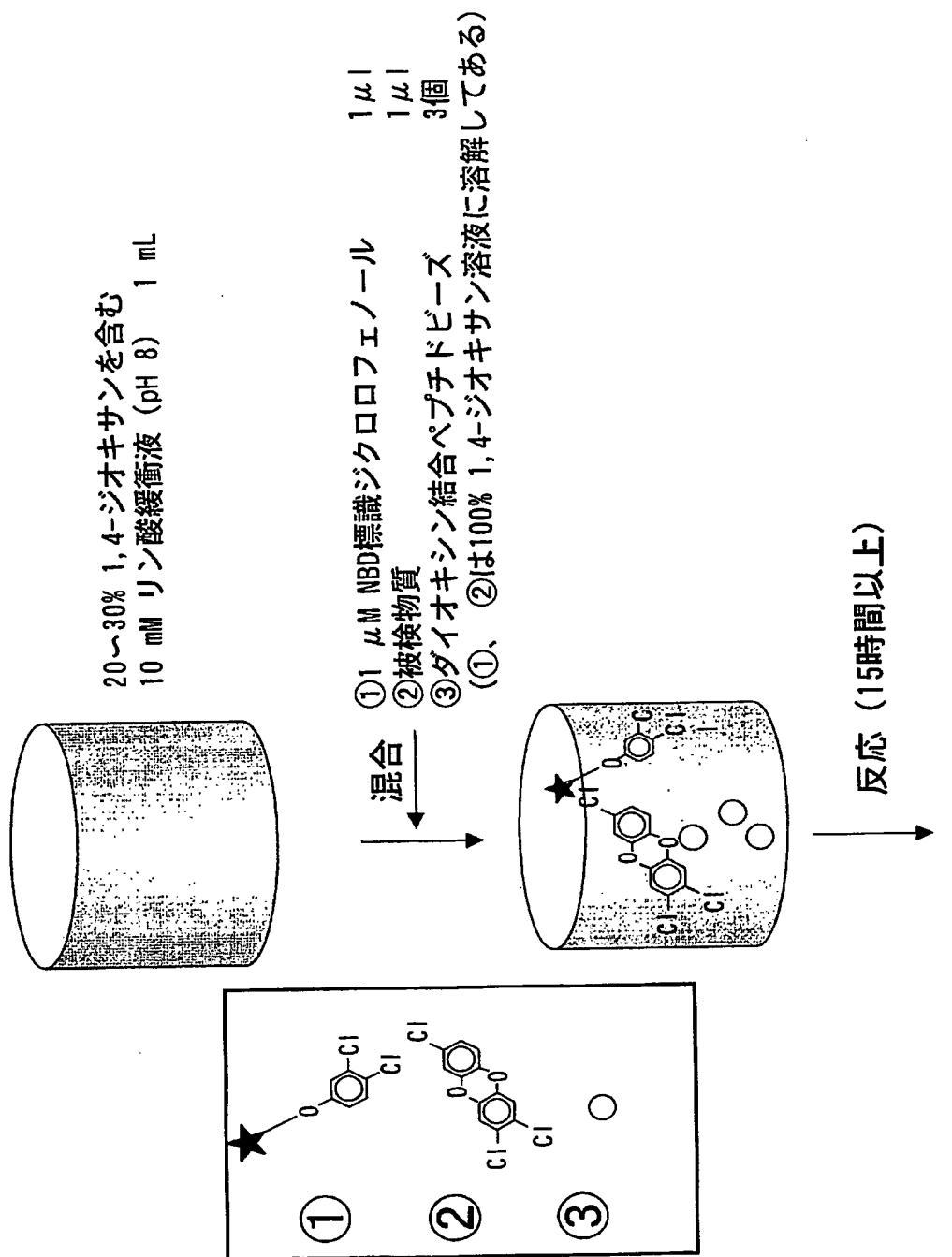
【図9】図9は、アミノ酸置換体ライプラリを示す。

【図10】図10は、アミノ酸置換体ライプラリのNBD標識ジクロロフェノールによる染色度合いをグラフに表す。

【図11】図11は、FLDQVペプチドのN末端を置換したダイオキシン結合ビーズによるダイオキシン検出の結果をグラフに表す。図中の●はFLDQV、○はFLDQVのN末端をシクロヘキシリラニンに置換したものと示す。

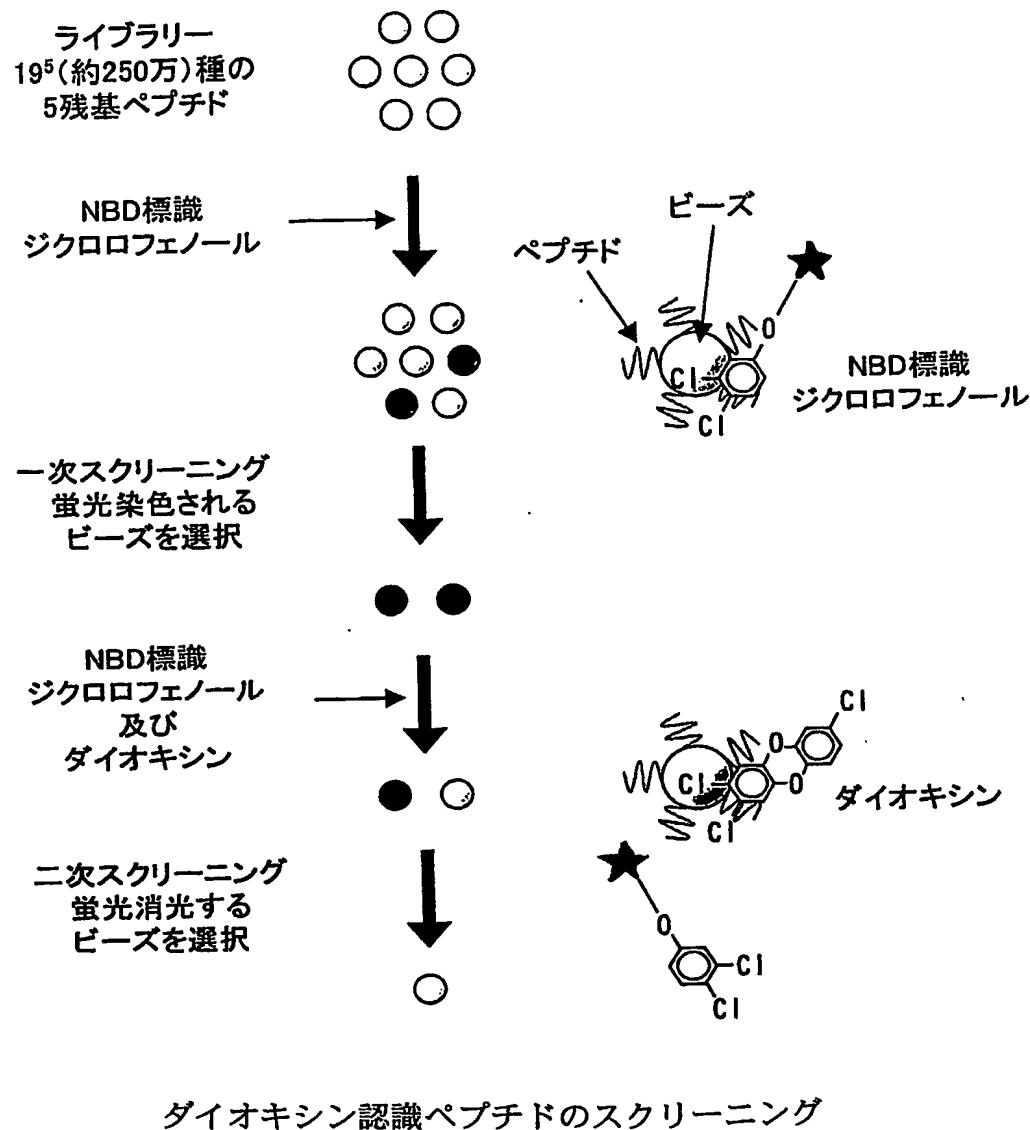
【図12】図12は、ダイオキシン濃度と蛍光染色および競合消光にかかる時間の関係をグラフに表す。10nM 2,3,7-TriCDD濃度は10 nMである。図中の●は10nM NBD標識ジクロロフェノール、▲は5nM NBD標識ジクロロフェノール、■は1nM NBD標識ジクロロフェノール、NBD標識ジクロロフェノールのみを実線、上記濃度で2,3,7-Tri-CDDを混合したものと示す。

【書類名】 図面
【図 1】



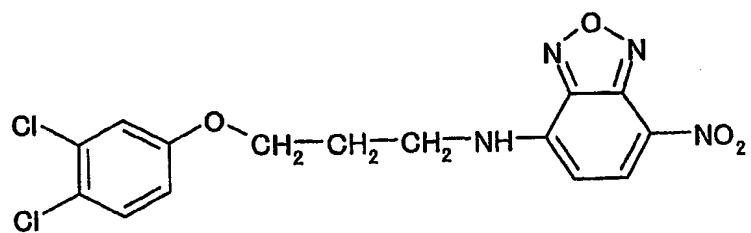
- ビーズの蛍光頭微鏡画像を記録する。
- 濃度既知サンプルを用いて試験を行い、検量線を作製する。
- 検量線より、試験物質の濃度を求める。

【図 2】

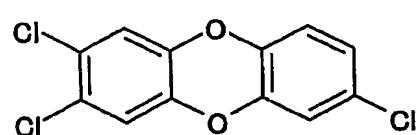


【図3】

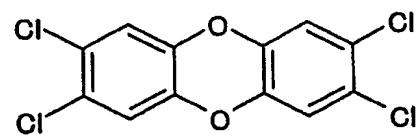
NBD標識ジクロロフェノール



2,3,7-TriCDD

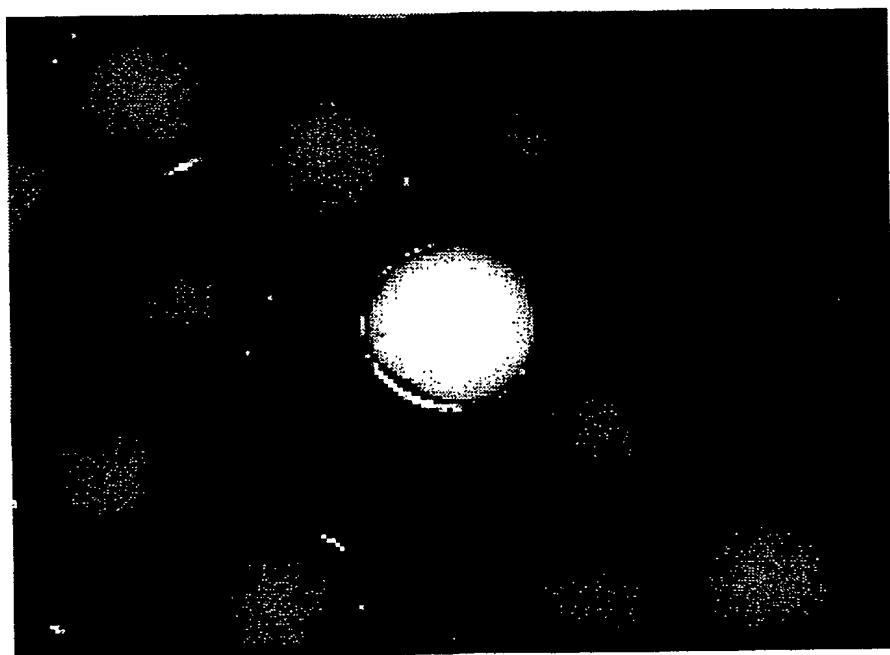


2,3,7,8-TeCDD



NBD 標識ジクロロフェノール及びダイオキシン類の構造

【図4】

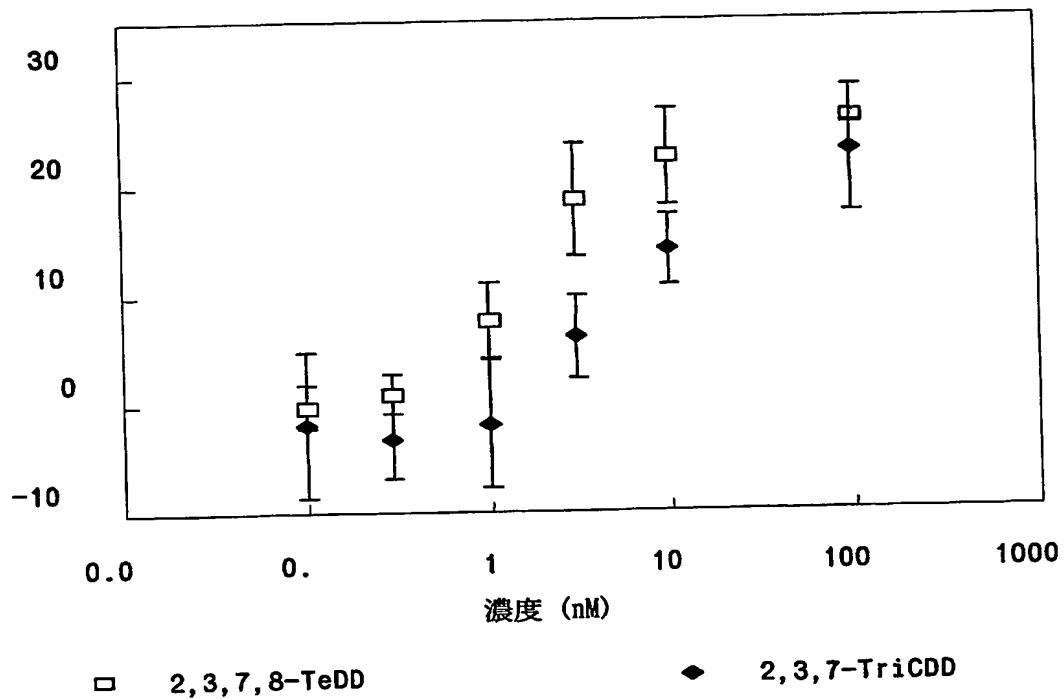


【図 5】

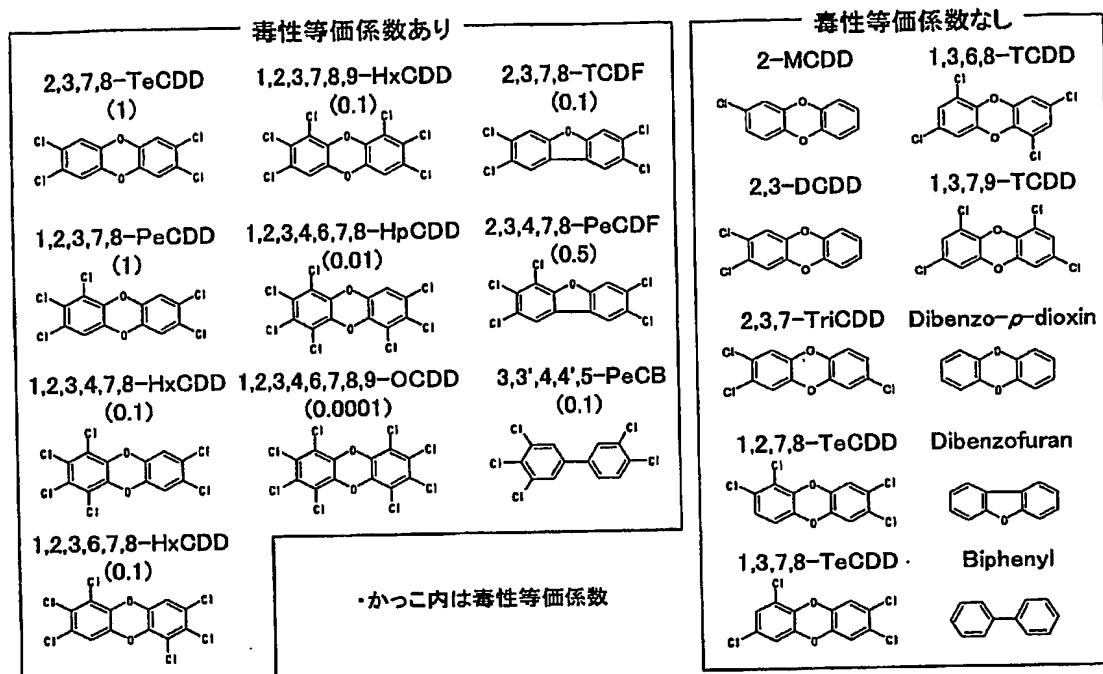
	染色前	染色後	競合後
NBD標識ジクロロフェノール濃度	0 nM	1 nM	1 nM
競合2,3,7-TriCDD濃度	0 nM	0 nM	10 nM (10倍当量)
DB2			
Reference(※)			

※ 一次スクリーニング時に蛍光染色されていないと判断したビーズ

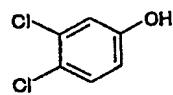
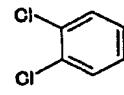
【図 6】



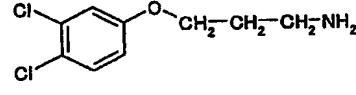
【図 7】



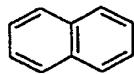
3,4-dichlorophenol

*o*-dichlorobenzene

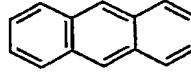
(3,4-dichlorophenoxy)propylamine



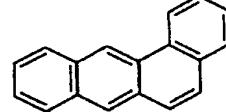
Naphthalene



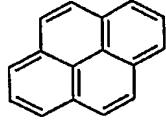
Anthracene



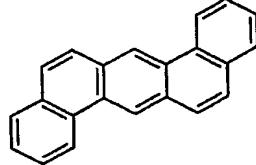
Benzo(a)anthracene



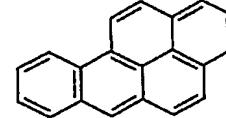
Pyrene



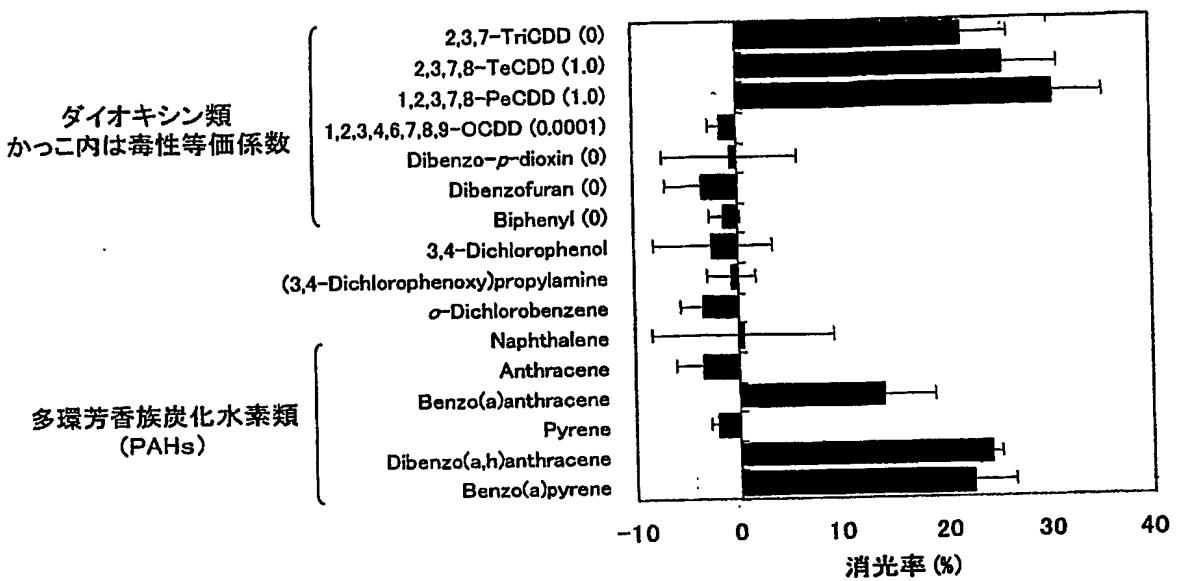
Dibenzo(a,h)anthracene



Benzo(a)pyrene



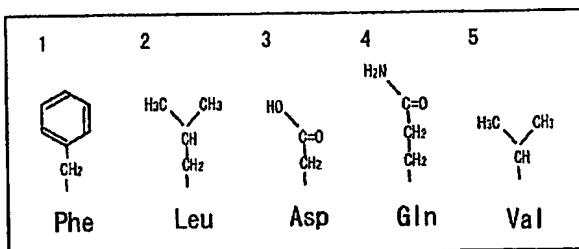
【図 8】



溶媒: 30% 1,4-ジオキサンを含むリン酸緩衝液、被検物質濃度: 30 nM

【図9】

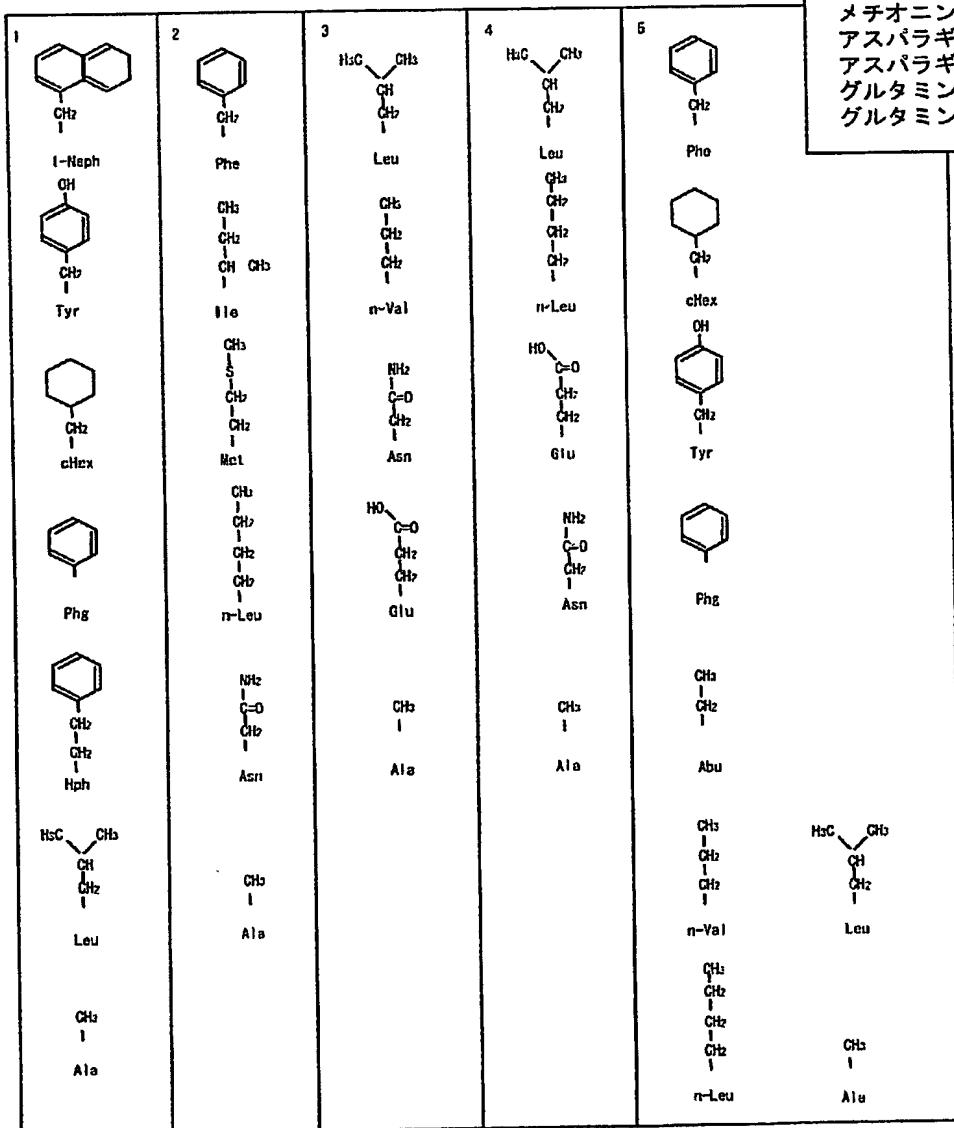
DB2アミノ酸側鎖構造



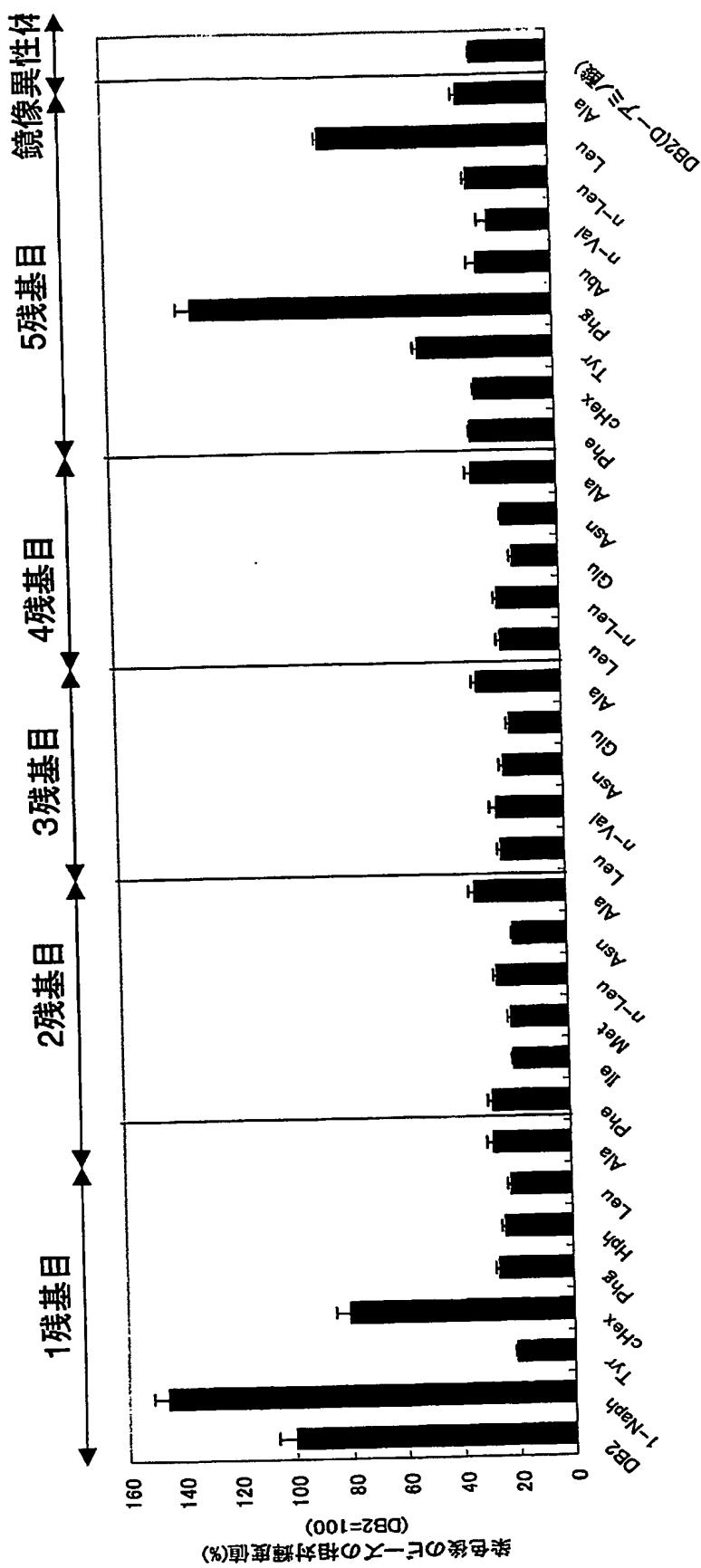
略語

フェニルアラニン (Phe)
 チロシン (Tyr)
 1-ナフチルアラニン (1-Naph)
 シクロヘキシルアラニン (cHex)
 フェニルグリシン (Phg)
 ホモフェニルアラニン (Hph)
 バリン (Val)
 アラニン (Ala)
 ロイシン (Leu)
 イソロイシン (Ile)
 アミノブチル酸 (Abu)
 ノルバリン (n-Val)
 ノルロイシン (n-Leu)
 メチオニン (Met)
 アスパラギン酸 (Asp)
 アスパラギン (Asn)
 グルタミン酸 (Glu)
 グルタミン (Gln)

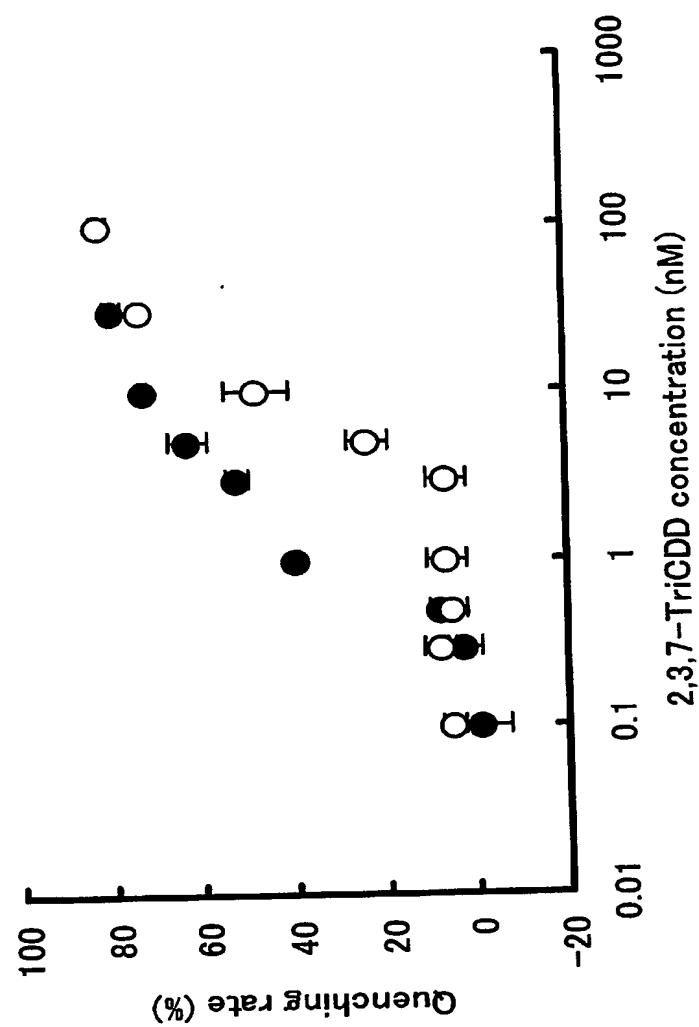
置換体アミノ酸側鎖構造



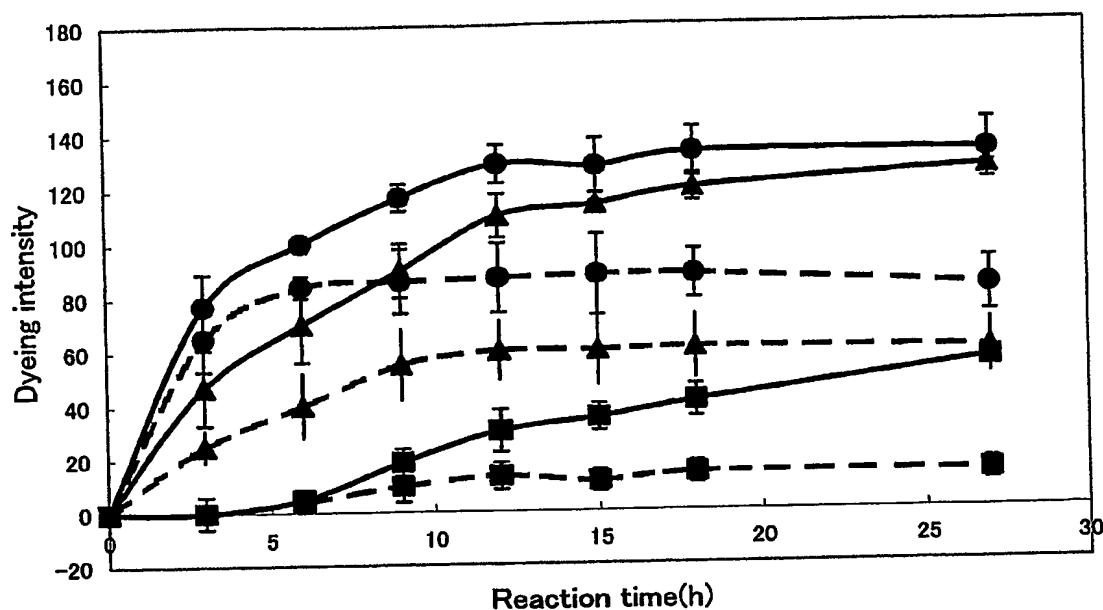
【図10】



【図11】



【図12】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 安価で、作成が容易な物質を用いたダイオキシンの検出手段を提供する。

【解決手段】

ダイオキシンに対し高い結合力を有する5残基のオリゴペプチドDB1 (FLDQI) 及びDB2 (FLDQV) は、3種の塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン (PCDDs) 及び一部の多環芳香族炭化水素類に結合したが、PCBには結合せず、高い結合選択性を有する。このオリゴペプチドをペプチド固相合成用ビーズ上に構築し、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンの検出が可能なオンビーズ競合消光測定方法およびビーズ上に2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンを濃縮する方法を提供する。

特願 2003-353026

出願人履歴情報

識別番号

[000223104]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 広島県広島市中区舟入町6番5号

氏 名 東和科学株式会社

特願 2003-353026

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所
氏名

2001年 4月 2日

新規登録

東京都千代田区霞が関 1-3-1
独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.